

氏名 タジック パルビズ

授与した学位 博 士

専攻分野の名称 学 術

学位授与番号 博 甲 第 1254 号

学位授与の日付 平成 6 年 3 月 25 日

学位授与の要件 自然科学研究科生物資源科学専攻

(学位規則第 4 条第 1 項該当)

学位論文題目 STUDIES ON FERTILIZATION *IN VITRO* OF BOVINE OOCYTES IN A CHEMICALLY DEFINED MEDIUM

(完全合成培地における牛卵子の体外受精に関する研究)

論文審査委員 教授 丹羽 皓二 教授 湯原 正高 教授 田辺 昭
教授 内田 仙二 教授 山本 格

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

本研究は、血清などの未知の成分を全く含まない無蛋白完全合成培地における体外受精系の開発を目的として行われた。その結果、5mMカフェインと10 μ g/mlヘパリンを含むBSA無添加受精培地（修正BO液）にポリビニールアルコール（PVA）を0.1～5 mg/mlの濃度で添加することによって、一部の裸化卵子に精子侵入が認められた（9～16%）。さらに、1 mg/mlのPVA添加培地において精子濃度の影響を調べた結果、10 \times 10⁶精子/mlにおいて高い（39%）精子侵入が得られた。また、培地のNaHCO₃濃度を37mMから46mMに高めるとともに、浸透圧を一定に保つためにNaCl濃度を112.0mMから103.0mMに減少させた場合、精子侵入率（70%）と前核形成率（94%）は非常に高くなった。この条件下で受精した卵子の一部（9～21%）は体外培養により胚盤胞にまで発生しうることも明らかにした。これらの結果から完全合成培地として開発した牛卵子体外受精用培地（BOFM）において高率の正常な受精卵の得られることが明らかとなった。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文は、無蛋白完全合成培地における牛卵子の体外受精に関する一連の実験を通して得られた次のような成果をまとめたものである。

1) 受精培地に添加する蛋白の種類と濃度が卵子の体外受精におよぼす影響：体外受精培地に含まれる未知成分は蛋白および卵丘細胞からもたらされる。そこでまず、これらの要因が受精におよぼす影響について検討した。受精培地(BO液)に添加する蛋白として、牛胎児血清(FCS)、子牛血清(CS)、または牛血清アルブミン(BSA)を用いた。その結果、卵丘細胞付着卵子への精子侵入率(89-100%)はこれらの蛋白の添加の有無にかかわらず高かったが、卵丘細胞を除去した裸化卵子においては、蛋白無添加では精子侵入はほとんど認められなかった(1%)。BSA、FCSあるいはCSの添加によって、ある範囲までは濃度依存的に精子侵入率が増加した。多精子受精率については5%のFCS添加において著しく高かった(97%)。

2) 無蛋白限定培地における卵子の体外受精：ポリビニールアルコール(PVA)を添加した無蛋白培地において牛精子の受精能獲得の誘起されうることが知られているので、裸化卵子のPVA添加BO液における体外受精が可能か否かを検討した。化学的成分を限定するために、フェノールレッドおよびペニシリンを除去したBO液(修正BO液)を基礎培地として用いた結果、PVA無添加の修正BO液では精子侵入は全く認められなかった。しかし、0.1-5 mg/mlのPVAを添加することにより精子侵入率(9-16%)は有意に増加したが、PVAの異なる濃度間では有意差は認められなかった。1 mg/mlのPVA添加培地を用いて精子濃度の影響を調べた結果、 10×10^6 精子/mlにおいて高い精子侵入率(39%)が得られたので、さらにこの条件下で浸透圧を一定

(332.6mOsm)とし、 NaHCO_3 濃度の影響について調べた。その結果、修正BO液の NaHCO_3 濃度が34mM(18%)、37-43mM(38-46%)、および46mM(70%)と高くなるにしたがって精子侵入率は有意に高くなった。これらの結果から、修正BO液をさらに修正した液を牛卵体外受精用培地(BOFM)として以後の実験に用いた。

3) BOFMにおけるグルコース、カフェインあるいはヘパリンの添加が卵子の体外受精および胚の発生におよぼす影響：1 mg/mlのPVA添加BOFMを用いて、グルコース

(13.9mM)添加あるいは無添加の条件下でカフェイン(5mM)およびヘパリン(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)のいずれか一方あるいは両者の添加が精子侵入におよぼす影響を調べた。その結果、カフェインとヘパリンのいずれも添加しなかった場合、卵子への精子侵入は全く認められなかった。卵子への精子侵入はヘパリン単独添加(35-45%)とカフェイン+ヘパリン添加(69-85%)ではグルコースの影響を受けなかったが、カフェイン単独添加ではグルコースを添加しなかった時(24%)と比較して添加した時(44%)の方が有意に高かった。授精後8時間で卵子を発生培地に移して培養した結果、2-細胞期以上への発生率(72-90%)および胚盤胞形成率(9-21%)は、いずれも受精時におけるグルコースの存在の有無による影響は認められなかった。

これらの知見から、受精の要因分析系の開発にきわめて有用であるのみならず、実用面においても応用されうる体外受精系の開発に役立つものと考えられる。本学位審査会は、

上記の論文内容および参考論文を総合的に審査し、本論文が博士（学術）の学位に値するものと判定した。